

**Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei**

**A Velvet komplexet felépítő fehérjék szerepe az *Aspergillus nidulans* és *Trichoderma reesei* gombfajok metabolit termelésében**

**Functions of the Velvet complex proteins in *Aspergillus nidulans* and *Trichoderma reesei***

Németh Zoltán

Témavezető/Supervisor: Dr. Fekete Erzsébet



**DEBRECENI EGYETEM**  
**Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola**

Debrecen, 2017

## 1. Bevezetés és célkitűzés

Az Ascomycota gombák a növényekhez hasonlóan helyhez kötött élőlények, és így az őket fogyasztó élőlények elleni harcban és az élőhelyért folytatott versenyben hihetetlenül változatos metabolizmusukkal, primer- és szekunder metabolitokkal, valamint extracelluláris enzimek termelésével juthatnak előnyökhöz. A fonalas gombák által előállított szekunder metabolitok egy tekintélyes része biotechnológiai jelentőséggel bír, de egyes metabolitok károsak is lehetnek humán szervezet számára. A hasznos vegyületek között találunk antibakteriális (pl. penicillin), antifungális (pl. caspofungin), rákellenes (pl. taxol), immunszuppresszív (pl. ciklosporin), koleszterinszint csökkentő (pl. lovastatin) hatásúakat is (Newman és Cragg, 2012). Azonban káros metabolitokat is előállíthatnak a gombák, melyek leginkább az *Aspergillus*ok, *Penicillium*ok és *Fusarium* genus fajaitól származtathatóak, de legismertebbek az egyes *Aspergillus*-ok által termelt aflatoxinok. A fonalas gombákat nem csak a szekunder metabolit termelésük okán hasznosítják az iparban, hanem a primer anyagszerűjükhöz köthető termékeik élelmiszeripari adalékanyagok is lehetnek (pl. citromsav, glükonsav, Berovic és Legisa, 2007; Singh és Kumar, 2009). Továbbá egyes fonalas gombák extracelluláris enzimtermelők, melyeket szintén az élelmiszeripar (pl. amilázok, lakkázok), de a papíripar és bioüzemanyag gyártók is hasznosíthatnak (cellulázok, hemicellulázok). Ezeknek a metabolitoknak a bioszintézisét komplex molekuláris szabályozási mechanizmusok irányítják. Az előállításukhoz szükséges enzimeket kódoló gének kifejeződését az eukarióta élőlényekben, így a gombákban is, több regulátor fehérfje akár együtt, de külön-külön is szabályozhatják.

Kutatásaink során a fény által befolyásolt Velvet komplex globális regulátort felépítő proteineket vizsgáltuk, mely konzervált az Ascomycetes-ekben (Ni és Yu, 2007). A Velvet komplex a sejtmagban jön létre a VeA, VelB és LaeA (*A. nidulans* nomenklatura szerint) proteinek kapcsolódásával és a fonalas gombák egyedfejlődését és a szekunder metabolitok képződését befolyásolják. Az *A. nidulans* által termelt és leggyakrabban vizsgált szekunder metabolit a sterigmatocisztin (továbbiakban: ST) képződését pozitívan regulálja a Velvet komplex, hiszen a komplexet felépítő proteineket

kódoló gének hiányában a mikotoxin képződés megszűnik (Bayram és mtsai, 2008). *T. reesei* esetében a Velvet komplexet felépítő fehérjék közül eddig csak a *laeA* ortológ *lae1* gén szerepét vizsgálták, melynek funkciója esszenciális a celluláz és hemicelluláz enzimek termelésében (Seiboth és mtsai., 2012). A dolgozatban látszólag két, egymáshoz nem kapcsolódó folyamatot vizsgálunk, mint az *A. nidulans* ST képződése és a *T. reesei* celluláz termelése, de e két jelenség szabályozása és indukálódásának körülményei nagy hasonlóságot mutatnak. A konzerváltságuk ellenére azonban a Velvet komplexet felépítő fehérjékhez kapcsolható funkciók egyáltalán nem általános érvényűek a fonalas gombák körében, így a filogenetikailag távol álló törzsekben eltérő lehet a két folyamat szabályozása.

A mikroorganizmusok életműködésében kulcsszerepet játszó regulátorok megismerése genetikai mutánsok létrehozását igényli, melyek fenotípus vizsgálatakor nehéz olyan tenyésztési körülményeket létrehozni, ahol az ezeket befolyásoló környezeti ingerek hatását külön-külön, vagy azokat kizárva lehet vizsgálni. Munkánk során egyik fő célkitűzésünk az volt, hogy meglévő fermentációs eszközeinkkel a genetikai mutánsok tenyésztésekor ezeket a környezeti hatásokat csökkentjük, vagy állandó értéken tartjuk. A Velvet komplexet felépítő fehérjék funkcióinak ily módon való vizsgálata akár új, eddig nem ismert szerepéről nyerhetünk információkat.

(1). Számos gazdaságilag és a humán egészségügyben érdekelt fonalas gomba esetén megvizsgálták a Velvet komplexet felépítő fehérjék szerepét. Azonban összesen eddig két olyan tanulmány született, ahol a Velvet gén funkcióját valamilyen enzim szintézisével hozták összefüggésbe (Kamerewerd és mtsai., 2011; Duran és mtsai., 2014). A nagymennyiségű cellulázt és hemicellulázt szekretálni képes *T. reesei* Velvet génjének funkcióját az extracelluláris enzimtermelésre gyakorolt feltételezett hatásával kapcsolatban kívántuk megvizsgálni. Célul tűztük ki, hogy *vell* hiánymutánsokat és a VEL1 proteint túltermelő mutánsokat vizsgálunk meg, mind az aszexuális/szexuális spóráképzés képességük kapcsán, mind a celluláz gének kifejeződésének mértéke alapján.

(2.) A *T. reesei* fonalas gomba kapcsán korábban leírták, hogy a Velvet komplexet felépítő LAE1 fehérje szükséges az extracelluláris celluláz és hemicelluláz enzimeknek az előállításához, melyet a *Δlae1* mutáns törzs tenyésztésével állapítottak meg. Viszont arra is figyelmesek lettek, hogy a gén hiánya megváltoztatta a tenyészet növekedésének sebességét (Seiboth és mtsai., 2012). Erre alapozva tűztük ki célul, hogy megvizsgáljuk a *T. reesei* LAE1 fehérjének a funkcióját különböző konstans növekedési ráták alkalmazása mellett, melyeket kemosztát fermentációval lehet kivitelezni. Kíváncsiak voltunk, hogy a LAE1 regulátor mely génekre hat, hogyan befolyásolja az egyes gének kifejeződését. Ez a kérdéskör a tenyészet steady-state állapotában vett mintákból és azokból kinyert totál RNS-ek microarray analizisével nyert expressziós mintázat elemzésével vizsgálható. Munkánk során a *lae1* hiánymutánst és a LAE1 fehérjét túltermelő mutánst kívántuk elemezni az azonos körülmények között növekedő szülői, QM 9414 törzs adatainak összehasonlításával.

(3.) Az *A. nidulans* laboratóriumi törzsek között gyakori genotípus a *veA* génnek egy pontmutációját hordozó *veA1* gén. Célul tűztük ki, hogy a *veA1* gént hordozó törzsek sterigmatocisztin termelő képességét összevessük a vad típusú *veA* gént hordozó törzsek produktivitásával. Ez pontos, reprodukálható HPLC-s módszer fejlesztését igényelte, így ellentétben a legtöbb közleménnyel, nem a törzsek összehasonlításán alapuló ST mennyiségeket, hanem egzakt értékeket kívántunk bemutatni.

(4.) Maggio-Hall és munkatársai (2005) tanulmányában közölt és Nancy P. Keller professzor asszony (Wisconsin, USA) nem publikált adataiból tudjuk, hogy a zsírsavak  $\beta$ -oxidációjában és az oxilipinek bioszintézisében mutáns törzsek számos szénforráson tenyésztve képtelenek ST képzésére. Ez a jelenség laktóz szénforrást alkalmazva nem állt fenn, az ST termelésük a vad törzsével volt összevethető. Célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk szénforrásként laktózt tartalmazó tápoldatban az *A. nidulans* (*veA*+) sterigmatocisztin képződését. Feltételeztük, hogy a laktóz lassú katabolizmusa állhat a jelenség mögött, melynek karbon katabolit derepressziós hatása van. A derepressziót kemosztát, folytonos tenyészetet alkalmazva lehet még tanulmányozni, mely során akár repressziót kiváltó D-glükózt is használhatunk szénforrásként.

## 2. Anyagok és módszerek

### 2.1. Felhasznált *Aspergillus nidulans* és *Trichoderma reesei* törzsek

A munkánk során felhasznált *Aspergillus nidulans* törzseket az 1. táblázat tartalmazza.

#### 1. táblázat Munkánk során felhasznált *A. nidulans* törzsek

Törzs	Genotípus	Hivatkozás
RDIT 9.32	<i>veA+</i>	Tsitsigiannis és mtsai. (2004)
RDIT 2.3	<i>veA1</i>	Tsitsigiannis és mtsai. (2004)
R21	<i>yA2; pabaA1; veA1</i>	Fantes és Roberts (1973)
V100 <sup>a</sup>	<i>creA44; pantoB100; veA1</i>	Shroff és mtsai. (1997) <sup>b</sup>
RJMP 155.55	<i>riboB2; wA3, veA+</i>	Prof. Nancy P. Keller
ZNEF 8.55 <sup>c</sup>	<i>creA44; pantoB100; riboB2; wA3; veA+</i>	Németh és mtsai. (2016)

A táblázat jelzései: <sup>a</sup> Az eredeti *creA44* mutáns keresztezéséből származó utód törzs (M. Flipphi, nem publikált eredménye); <sup>b</sup> Hivatkozás az eredeti mutánsra: Shroff és mtsai., 1997; <sup>c</sup> A V100-as és RJMP 155.55 jelzésű törzsek keresztezéséből származó utódtörzs.

Az általunk létrehozott mutánst ZNEF 8.55 (Zoltán Németh, Erzsébet Fekete) jelzéssel láttuk el, mely keresztezéssel lett előállítva a V100 jelzésű törzs (*creA44; pantoB100; veA1*) és az RJPM 155.55 jelzésű törzs (*riboB2; wA3, veA+*) meiotikus rekombinációjával (Clutterbuck 1974). Az utódtörzsek *veA+/veA1* azonosítása PCR módszerrel történt, ahol a megfelelő primerpárok megválasztásával megkülönböztethető a vad típusú *veA* allél a *veA1* alléltól, melyben nonsense mutáció van (Han és mtsai., 2010). Az utódtörzsek *creA44* genotípus azonosítását a megváltozott laktóz hasznosításon alapuló X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indol-1-β-D-galaktóz) módszerrel teszteltük (Shroff és mtsai., 1997), ahol a tenyészet 1% D-glükózt tartalmazó táptalajon kék színnel jelzi a konstitutívan kifejeződő β-galaktozidáz enzimet.

A kísérleteink során felhasznált *Trichoderma reesei* mutáns törzseket az 2. táblázat tartalmazza, melyeket a Vienna University of Technology (TU Wien, Bécs, Ausztria) munkatársai hoztak létre.

A CPK 3793 (*Δlae1*) és CPK 4087 (*OElae1*) törzsek a Seiboth és munkatársai által 2012-ben közölt munka során lettek létrehozva. A *T. reesei* QM 9414 törzs *lae1* génje a *T. reesei pyr4*-re (orotidin 5'-foszfát dekarboxiláz gánje) lett kicserélve, míg a túltermelő törzseknek a *lae1* promóterét a *T. reesei* háztartási *tefl* (transzlációs elongációs faktor 1- $\alpha$  kódol) promóterével helyettesítették (Akel és mtsai., 2009).

## 2. táblázat A munkánk során felhasznált *T. reesei* törzsek

Törzs	Genotípus	Hivatkozás
QM 9414	<i>mat1-2</i>	Seidl és mtsai. (2009)
CBS 999.79	<i>mat1-1</i>	Seidl és mtsai. (2009)
CPK 3793	<i>Δlae1</i>	Seiboth és mtsai. (2012)
CPK 4087	<i>OElae1</i>	Seiboth és mtsai. (2012)
RKA 12	<i>OEvell; mat1-2</i>	Karimi-Aghchek és mtsai. 2014
RKA 13	<i>OEvell; mat1-2</i>	Karimi-Aghchek és mtsai. 2014
RKA 14	<i>Δvell; mat1-2</i>	Karimi-Aghchek és mtsai. 2014
RKA 17	<i>Δvell; mat1-2</i>	Karimi-Aghchek és mtsai. 2014
RKA 18	<i>Δvell; mat1-2</i>	Karimi-Aghchek és mtsai. 2014

A *T. reesei vell* hiánymutáns törzsek és a *vell* túltermelő törzsek kialakítását Razieh Karimi Aghchek végezte a Vienna University of Technology (Bécs, Ausztria) laboratóriumában. A QM9414 jelzésű celluláz termelő törzs *vell* génjét (1,8 kb) az *E.coli* higromicin B foszfofotranszferáz

(*hph*) génjére cserélte. A *vel1* mutáns törzsek retranszformálása sikertelen volt, 200 izolátum vizsgálata során nem találtak stabilan integrálódott *vel1* gént. Ezért a *vel1* gén túltermeltetése érdekében a *vel1* promóterét egy erősen kifejeződő háztartási gén, a *tef1* gén promóterére cserélték.

## 2.2. Törzsfenntartás

A *A. nidulans* törzseket 10 g/L glükóz és a törzs auxotrófia igényeit biztosító vitaminokkal kiegészítve ún. spóráztató agarra (Pontecorvo és mtsai., 1953) oltottuk le, 3-4 napig 37 °C-on növesztettük, majd felhasználásig +4 °C-on tároltuk.

A *T. reesei* tenyészeteket PDA (potato dextrose agar) táptalajon 3-4 napig 28 °C-on növesztettük, majd 4 °C-on tároltuk felhasználásig.

A törzsek hosszútávon történő megőrzése érdekében a lemosott és üveggyapoton átszűrt spórapadatokat 50%-os glicerinnel oldatban -80 °C-on tároltuk.

## 2.3. Tenyésztési körülmények

### 2.3.1. *Aspergillus nidulans*

Az *A. nidulans* rázott lombikos tenyésztései, valamint a batch, fed-batch és kemosztát folytonos fermentációi során az *Aspergillus* Minimal Medium (v. „Minimál táptalaj”) egy módosított változatát (AMM2) használtuk tápoldatként (Fekete és mtsai., 2002), mely annyiban különbözött az AMM tápoldattól, hogy a 6 g/L NaNO<sub>3</sub> nitrogénforrás helyett 8 g/L NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-et tartalmazott és 0,1 g/L CaCl<sub>2</sub>-dal volt kiegészítve.

Az *A. nidulans* tenyésztések során alkalmazott 3 különböző szénforrást (glicerinnel, D-glükózzal, és laktózzal) 1,5%-os (w/v) végkoncentrációban mindig utólag adtuk a már steril tápoldathoz.

Az *A. nidulans* törzsek batch és fed-batch tenyésztését 7 L teljes és 6 L hasznos térfogatú üvegfermentorban végeztük (Inel Kft, Budapest, Magyarország). A hőmérsékletszabályozást (37 °C) belső hőcserélő, a fermentálé homogenizálását két 6 lapátos Rushton turbina keverő oldotta meg. A bioreaktorokban való tenyésztés során a kémhatás állandó értéken való tartása érdekében (pH=6,5) automatikus pH szabályozást végeztünk 3 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> és 3 M NaOH segítségével. Az oldott oxigén szintet minimum 20%-on tartottuk, melyet 0,5 VVM levegőztetéssel és szükség esetén a keverő

fordulatszámának automatikus növelésével állítottuk be. A fény hatásának kiküszöbölése érdekében az egész fermentortestet alufóliával takartuk be.

A fermentor leoltására inokulum tenyészetet növesztettünk, melynek mennyisége minden esetben a fermentációs tápoldat végtérfogatának 10%-a volt. Az inokulum tenyészetet 500 ml-es Erlenmeyer lombikban 100 ml AMM2 tápoldatot 15 g/L glicerinnel szénforrással kiegészítve  $10^8$  db spórával oltottuk le, majd 37 °C-on 200 rpm rázatással növesztettük. 24 óráskorban a tenyészetet zsugorított üvegszűrőn keresztül mostuk, majd a micéliumot úgynevezett leoltólombik segítségével jutattuk a fermentorba.

A fed-batch tenyésztés körülményei és kivitelezése azonos volt a batch fermentációval azzal a különbséggel, hogy D-glükózt ráadagolást végeztünk 10-10 g/L mennyiségben, két időpontban.

### **2.3.2. *Trichoderma reesei***

*Trichoderma reesei* rázott lombikos tenyésztései, valamint a batch és kemosztát folytonos fermentációi során alkalmazott tápközeg kémiaiilag definiált MA (Mandels és Andreotti, 1978) tápoldat volt.

A *T. reesei* VEL1 funkciójának vizsgálatai során a törzseket 20 L teljes, 15 L hasznos térfogatú korróziómentes acélfermentorokban tenyésztettük a celluláz géneket indukáló laktózzal 15 g/l kezdeti koncentrációjú szénforráson. A fermentációs paraméterek a következők voltak: 0,5 VVM levegőztetés, 28 °C hőmérséklet, 400 rpm mechanikus kevertetés két hatlapátos Rushton turbinával, a kémhatást pH=5 értéken tartottuk az egész fermentáció ideje alatt 3 M  $H_3PO_4$  és 3 M NaOH segítségével. Az erős habzás csökkentésének érdekében polipropilén-glikol 2000 habzásgátlót használtunk. A fermentáció inokulumaként spóráról (*Δvel1* mutáns esetén micéliumról) indított ( $10^8$  db spóra/100 ml tápoldat) rázott lombikos tenyészeteket növesztettünk MA tápoldatban glicerinnel szénforráson (1 % w/v) a csírázást segítő kiegészítők hozzáadásával: urea 0,3 g/L; húspepton 1 g/L; Tween 0,5 ml/L. Az inokulum 24 óráskor 250 rpm-mel való rázatását követően a tenyészetet leszűrjük, hideg steril vízzel átmostuk, majd leoltólombikon keresztül a fermentorba juttattuk.

A szoforóz (2-O-β-glükopiranozil-D-glükóz) az egyik fő induktora a celluláz géneknek *Trichoderma reesei*-ben (Sternberg és Mandels, 1979). Az



indukciós kísérlet során előnövesztett tenyészetet használtunk majd a micélium átmosását követően MA tápoldatba kerültek, mely 10 mM koncentrációban tartalmazott szoforózt.

A *T. reesei* VEL1 funkciójának hatását vizsgáló, különböző minőségű szénforráson való növekedési tesztet MA táptalajon végeztük 2% agarral szilárdítva. A táptalajban a különböző szénforrások (D-glükóz, D-galaktóz, cellobióz, laktóz és cellulóz) 10 g/l végkoncentrációban lettek bemérve. A QM 9414 és az *OEvel1* törzsek a Petri-csésze közepére felvitt 10 µl  $10^5$  db konidium/ml spóraoldattal, míg a *Δvel1* törzsek micéliumról lettek indítva. A tenyészetek 28 °C-on növekedtek Sanyo inkubátorban, mely Philips-master fényforrással (TLD-15 W/840) lett folyamatosan megvilágítva, míg a sötét tenyésztés alufóliával duplán betekert Petri-csészéken történt.

### 2.3.3. Kemosztát feremntációk

A *T. reesei* LAE1 funkciójának konstans növekedési rátán való vizsgálatát és az *A. nidulans* sterigmatocisztin termelésének növekedési ráta függését azonos felépítésű, 2,5 L teljes, 2 L hasznos térfogatú üvegfermentorokban (Inel Kft., Budapest, Magyarország) végeztük. A kemosztát folytonos fermentáció során a tápoldat ráadagolásának sebessége és a fermentlé elvételének sebessége megegyezik, mellyel a tenyésztés térfogatát és növekedési rátáját konstans értéken tartottuk. A bioreaktort alufóliával takarva fénymentes kondíciót tudtunk létrehozni. A hőmérséklet és a pH-t a gombatörzsek igényeinek megfelelően (lásd fenn) állandó értéken, a kevertetést 300 rpm-en és a levegőztetést 0,3 VVM értéken tartottuk. A ráadagolt tápoldat *A. nidulans* esetén AMM2, míg *T. reesei* esetén MA tápoldat volt 3 g/L D-glükózzal és 0,1 g/L peptonnal kiegészítve. Ez a szénforrás koncentráció mindkét gombafaj számára megfelelően alacsony, hogy szén-limitációt érzünk el mind magas ( $0,09$  és  $0,075 \text{ h}^{-1}$ ), mind alacsony ( $0,02 \text{ h}^{-1}$ ) hígítási ráta mellett (Karaffa és mtsai., 2006; Portnoy és mtsai., 2011). A tenyészet az inokulálást követő 24 órában a szakaszos fermentációknak megfelelően növekedett. A ráadagolás/elvétel kezdetétől a fermentációs térfogat 6-7-szeri átforgatásával lehetett elérni, hogy a kezdeti biomassa oszcilláció megfelelően alacsony szintre

csökkenjen (Brown 1999). A steady-state a D-glükóz koncentráció a tápoldatban 0,05-0,08 mM közé esett, mely korrelál a fonalas gombák magas affinitású hexóz transzportereinek működésével (Jorgensen és mstai, 2007). A steady-state állapotban levő tenyészetből 3-5 alkalommal vettünk mintát, melyekből *A. nidulans* esetén ST detektálást, *T. reesei* esetén pedig totál RNS izolálást végeztünk.

## **2.4. Analitikai módszerek**

### Száraz sejttömeg meghatározása:

A növekedést a tenyészetek egységnyi térfogatára vonatkoztatott szárazanyag tartalmának (Dry Cell Weight, DCW) gyarapodására vezettük vissza. A micélium leszűrését és átmosását követően 80 °C-on súlyállandóságig szárítottuk. A száraz sejttömeg adatai két különböző mérés átlagából származnak, mely értékeinek átlagos eltérései nem haladták meg a 14%-ot.

### Szénhidrátok koncentrációjának meghatározása:

A munkánk során a folyékony tenyészetekből vett minták szénforrás koncentrációit (D-glükóz, laktóz, glicerin) HPLC-vel határoztuk meg. Az elválasztásra ioncserélő ( $H^+$ ) oszlopot (Bio-Rad Aminex HPX-87H<sup>+</sup>) használtunk izokratikus elúcióval (10 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eluens, 55 °C kolonna hőmérséklet) és detektorként törésmutató (RI) detektort alkalmaztunk.

### Sterigmatocisztin koncentrációjának meghatározása:

A sterigmatocisztin koncentrációja mind folyékony, mind szilárd tenyésztési körülmények között meglehetősen alacsony (néhány mg/l), ezért a detektálhatóság érdekében koncentrálni szükséges. 20 ml fermentlevet 3x10 ml etil-acetáttal extraháltunk és a szerves fázis gyűjtését követően vákuum bepárló segítségével szárítottuk. A bepárolt mintát 1 ml acetonitrilben oldottuk vissza. Szilárd fázisú tenyészetből való extrakció annyiban különbözött, hogy az etil-acetát adagolás előtt a kivágott agardarabokat (a gombamicéliummal együtt) melegítéssel felolvasztotuk. Az extrakció hibaátlagja 5% alatt volt. A sterigmatocisztin koncentrációjának meghatározása HPLC-UV analízissel (HP 1090 Series L/M Liquid Chromatographs, Agilent-Technologies) történt. A csúcsok hitelesítését ST standard addíciós módszerrel (Sigma-Aldrich Kft.) és a koncentrációját az ST

standard oldat 4 pontos kalibrációs egyeneséből kalkuláltuk. A minta elválasztását egy reverz fázisú C18-as kolonnán (Phenomenex Luna 5  $\mu$ m C18) végeztük, ahol az eluens víz:acetonitril (4:6 v/v) elegy, mely nátrium-acetát és ecetsavval volt puffereelve és pH=4,8-ra állítva. Mivel az ST meglehetősen stabil molekula ( $pK_a=9,58$ ), az eluens kémhatása nem módosítja a molekula struktúráját, de a savas oldat szükséges a szennyezőktől való megfelelő elválasztáshoz. Az izokratikus elúció során az áramlási sebességet 0,5 ml/min értéken tartottuk, a kolonna hőmérséklete 55 °C és az UV detektorral 245 nm hullámhosszon történő elnyelést mértünk. E módszer alkalmazásával az ST retenció ideje 11,9 perc és a detektálás alsó határa 0,1 mg/l.

#### Fehérje tartalom és celluláz enzimaktivitás meghatározása:

A sejtmentes fermentlé fehérjetartalmának meghatározását Bradford (1976) által kidolgozott módszer szerint határoztuk meg. A celluláz enzimaktivitás mérésére a karboxi-metilcellulóz (CMC, 1 % w/v) módszert alkalmaztuk (Uzbas és mtsai., 2002), amely a cellulitikus enzimkomplex által lehasított redukáló cukrok mennyiség mérésén alapul.

#### Génexpresszió vizsgálata kvantitatív PCR-el:

A DNáz-zal (DNase I, RNase free; Thermo Scientific) kezelt RNS-ek (5  $\mu$ g) reverz átírását a Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis kit-tel (Roche) végeztük a gyártó által leírt protokoll alapján, kiegészítve oligo-dT és random hexamer primerekkel. A qPCR méréseket Dr. Paholcsek Melinda (Humán genetikai Tanszék, Debreceni Egyetem, Debrecen) BioRad (Hercules, CA) iCycler IQ készülékkel végezte. Az amplifikációs protokoll egy kezdő denaturációt (3 perc, 95 °C) követően 40 ciklusos denaturációból (15 sec., 95 °C), annealációból (20 sec., a primereknek megfelelő hőmérsékleten (4 - 5. függelék) és elongációból (10 sec., 72 °C) állt. A PCR efficienciát a cDNS-ek hígításainak (1; 0,1; 0,01; 0,001) reakcióból határozták meg. Az amplifikáció efficienciát az IQ5 Optical System Software v2.0 által kapott meredekségekből számolták. Az expressziós arányokat a REST© szoftver alkalmazásával kalkuláltuk (Pfaffl és mtsai., 2002; Veiga és mtsai., 2012). A minták analízise legalább két független kísérletből 3 ismétléssel történt.

### Transzkriptum analízis:

A totál RNS izoláláshoz SV Total RNA Isolation System (Promega) kisset használtunk a gyártó által leírtak szerint. A cDNS szintézisét és hibridizációját a Roche NimbleGen (Roche-NimbleGen, Inc., Madison, WI, USA) végezte nagy érzékenységű oligonukleotid microarray módszerrel 60-mer próbákat használva, melyek alkalmasak a megvizsgált 9129 *T. reesei* gén expressziójának detektálására (Metz és mtsai., 2011). A microarray analízis által adott adatok begyűjtésének és azonosításának a Metz és munkatársai (2011) közleményében leírt beállításai alkalmas arra, hogy a különböző expressziós szintek között szignifikáns különbséget tegyenek. A gének azonosítása a teljes egészében manuálisan annotált *T. reesei* genom adatbázis segítségével történt, mely Chritian P. Kubicek (Institute of Chemical Engineering, Vienna University of Technology, Vienna) szabadalma. A transzkriptum analízis bioinformatikai adatelemzését Christian P. Kubicek végezte. Az Euklideszi távolságokat metrikus módszerrel a DNSSTAR v5.1.2. build 3 (DNSstar Inc., Madison, WI) hierarchikus klaszterezést alkalmazva adta meg. Az azonosított gének annotálását a MIPS Functional Catalogue-ban Mizzen és Allis (1998) közleménye szerint végezte. A mikorarray adatok és a kapcsolódó protokollok elérhetőek a GEO weboldalon a GSE55652 csatlakozási számon ([www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)) A transzkriptumok a genom klasztereibe való azonosítása szintén Christian P. Kubicek munkájának köszönhető. A szoftver és a dokumentáció letölthető: <http://tele-thon.bio.unipd.it/bioinfo/reef/>.

### Nukleinsav izolálás és hibridizáció:

A gombamicéliumokat Miracloth segítségével szűrtük, majd desztillált, hideg vízzel mostuk és azonnal folyékony nitrogénben fagyasztottuk. A lefagyasztott biomasszát nitrogénnel hűtött moszában porrá őröltük. A genomi DNS, plazmid DNS, és RNS tisztításokat a gyártó által kiadott protokoll szerint végeztük (Wizard Genomic DNA Purification Kit, PureYield Plasmid Midiprep System és SV Total RNA Isolation System; Promega). A nukleinsavak elektroforézisét, blotolását és hibridizációját standard molekuláris biológiai módszerekkel végeztük.

## 2.5. Morfológiai vizsgálat

A *T. reesei* QM 9414 és *Δvell* mutáns törzs morfológiai vizsgálatát rázatott lombikos tenyészetekkel végeztük MA tápoldatban, szénforrásként 10 g/L glicerinnel szénforrással. Natív és laktófenol cotton blue (LPCB) festékkel festett mintákat analizáltunk Zeiss AxioImager, AxioCam MRc5 kamerával felszerelt mikroszkóppal. A képek analízisét Axio-Vision AC képanalizátor szoftverrel végeztük (Version 4.6.3, Carl Zeiss).

## 2.6. Szexuális és aszexuális spóráképzés vizsgálata

A szexuális reprodukció vizsgálatához a *T. reesei* QM 9414, *vell* és *OEvell* törzseket a párosodási partnerükként alkalmas CBS 999.79 törzsszel tenyésztettük (Seidl és mtsai., 2009). A PDA táptalajon kinőtt (4 nap) gombákat agarkockával együtt áthelyeztük egymással szembe, friss PDA táptalajra. A tenyészeteket 4-7 napig növesztettük természetes megvilágításban, illetve sötét körülmények között. Az egymással termőtest képzésre képes tenyészetekből askospórát gyűjtöttünk és a spórák életképességét PDA táptalajon vizsgáltuk. A fényfüggő konidiospóra képzés vizsgálatához a tenyészeteket 8 napig vagy teljes sötétségben, vagy 12 óra megvilágítás/12 óra sötétségben növesztettük. A konidiospórák gyűjtését 1% w/v Tween-t és 0,8% w/v NaCl oldatot alkalmazva vittük szuszpenzióba, melyeket üveggyapoton keresztül szűrtünk, majd számoltunk.

## 2.7. Bioinformatikai elemzés

A PEST régiók azonosítását, melyek a gyors protein degradációhoz vezetnek és tipikusak a nem stabil fehérjékre az epestfind program alkalmazásával végeztük (Rechsteiner és mtsai., 1987; <http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/pepfind>). A proteinek sejten belüli lokalizációjának analizésére a WoLF PSORT (Protein Subcellular Localization Prediction tool; Horton és mtsai., 2007) programot, a leucin gazdag nukleáris export szignálokat (NES) a NetNES 1.1 Server (la Cour és mtsai., 2004; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES>) segítségével azonosítottuk.

### 3. Új tudományos eredmények

- A *Trichoderma reesei* *veA* ortológja a *vel1* hiánya teljesen megszünteti a konidiospóra képzésének képességét.
- A *Trichoderma reesei* VEL1 fehérje szükséges a szexuális egyedfejlődéshez.
- A *Trichoderma reesei* cellulázok és hemicelluláz enzimtermelése és az azokat kódoló gének kifejeződése teljes mértékben függ a VEL1 funkciójától.
- A *T. reesei* VEL1 proteinjének túlermelése magasabb celluláz és hemicelluláz produkciót eredményez.
- A Velvet komplex nem csak a fonalas gombák szekunder metabolit termelésére és egyedfejlődését szabályozhatja, hanem az extracelluláris enzimtermelést is.
- *T. reesei*-ben a LAE1 hatása a szekunder metabolizmusra növekedési ráta függően jelenik meg és kifejezőbb magas növekedési rátán.
- A LAE1 funkciójától függő gének többsége *T. reesei* genomban nem génklaszterekben helyezkednek el.
- A *T. reesei* *Alae1* mutánsban a GCN5-N-aciltranszferázokat (GNAT) kódoló gének 50%-ának az expressziója alulszabályozottan változott meg a szülői törzshöz képest. A GNAT enzimek egy alcsoportja a hisztonokat egy specifikus lizin részen acetilálva transzkripció aktivitáshoz vezet és a kromatin állapotát az aktív kromatinállapot irányába modulálja (Grunstein 1997; Mizzen és Allis 1998). Tehát a LAE1 tanulmányunk szerint is részt vesz epigenetikai szabályozásban közvetett módon, a GNAT enzimek kifejeződésének szabályozása révén
- A LAE1 egyértelműen befolyásolja az aminosav transzportereket kódoló gének kifejeződését, mely magyarázatot ad a *T. reesei* aminosav igényére cellulóz és laktóz szénforráson való növekedés közben.

- A *veA* génről egy pontmutáció következtében képződő VeA1 fehérje jelenlétében az *A. nidulans* 10-15-ször kevesebb sterigmatocisztin képzésére képes.
- Az *Aspergillus nidulans* lassú növekedése indukálja, míg a magas represszálja a sterigmatocisztin termelését. Tehát a növekedési ráta mértéke van közvetlen kapcsolatban az sterigmatocisztin képződéssel.
- Konstans növekedési ráta alkalmazása a fonalas gombák tenyésztése során új megvilágításba helyezheti azok szekunder metabolit termelését és génregulációját.

## 4. Összefoglalás

A fonalas gombák által termelt metabolitok bioszintézisét komplex molekuláris szabályozási mechanizmusok irányítják. Az előállításukhoz szükséges enzimeket kódoló gének kifejeződését az eukarióta élőlényekben, így a gombákban is, több regulátor fehérje akár együtt, de külön-külön is szabályozhatja. A globális regulátorok általában a környezeti ingerek hatását közvetítve a fonalas gombák egyedfejlődésére és metabolitjainak bioszintézisére is kiterjedve befolyásolják a gének kifejeződését. A fény hatására megváltozott folyamatokat az *A. nidulans*-ban leírt VeA protein közvetíti, mely a LaeA és VelB proteinnel kapcsolódva (Velvet komplex) a szekunder metabolitok bioszintézisét is szabályozza. A tanulmányok többsége a Velvet komplex és az azokat felépítő proteineknek a fonalas gombák szexuális/aszexuális egyedfejlődésére és szekunder anyagcsere termékeinek bioszintézisére kifejtett hatásáról számolnak be, az extracelluláris enzimtermelésre kifejtett hatásukról keveset tudtunk. A magas extracelluláris cellulázokat és hemicellulázokat termelő *T. reesei*-ben a Velvet komplex proteinjeit kódoló gének ortológjai megtalálhatóak, melyek közül a LAE1-ről tudtuk, hogy mind az aszexuális sporulációhoz mind az enzimek termeléséhez esszenciális. A *lae1* gén és annak termékének hiánya azonban megváltoztatta a gomba növekedési sebességét, ezért célul tűztük ki, hogy konstans növekedési ráta beállítása mellett megvizsgáljuk, hogy a szülői, QM 9414 törzshöz képest a gének kifejeződését hogyan befolyásolja a *lae1* gén hiánya, illetve annak túltermeltetése. Az eredmények megerősítettek számos előzőleg feltételezett hipotézist, de néhány eddig nem feltételezett funkciót is találtunk. Megállapítható, hogy a LAE1 hatása főleg a gén deléciójával válik jobban megfigyelhetővé, míg túltermeltetése kevésbé látványos eredményeket ad. A LAE1-nek egy új funkcióját azonosíthattuk, amelyben a GCN5-N-acetiltranszferázok helyezik új megvilágításba a LAE1 mechanizmusát. A *T. reesei*  $\Delta lae1$  mutánsban a GCN5-N-aciltranszferázokat (GNAT) kódoló gének 50%-ának az expressziója alulszabályozottan változott meg a szülői törzshöz képest. A GNAT enzimek egy alcsoportja a hisztonokat egy specifikus lizin részen acetilálva transzkripciósz aktivitáshoz vezet és a kromatin állapotát az aktív kromatinállapot irányába modulálja



(Grunstein 1997; Mizzen és Allis 1998). Tehát a LAE1 tanulmányunk szerint is részt vesz epigenetikai szabályozásban közvetett módon, a GNAT enzimek kifejeződésének szabályozása révén. A másik géncsoport, melyet a vizsgálataink során egyértelműen befolyásolt a LAE1 az aminosav transzportereket kódoló gének közé tartoznak. A LAE1 hatása az aminosav permeázokra megerősíti azt az eredményünket, hogy a *T. reesei*  $\Delta lae1$  mutánsban főleg magas növekedési rátán az aminosav metabolizmusba részt vevő gének alulszabályozottak. A LAE1 hatása az aminosav permeázok kifejeződésére magyarázatot ad a *T. reesei* aminosav igényére cellulóz és laktóz szénforráson való növekedése közben. A LAE1 által befolyásolt génklaszterek a genomban azonban kevésbé voltak megfigyelhetők a vizsgálataink során, ami talán annak köszönhető, hogy glükózt használtunk szénforrásként vagy az, hogy konstans növekedési rátát alkalmaztunk. Fontos észrevétel, hogy a *lae1* gén deléciója a növekedési ráta által hatással van a génextpresszió szabályozására. A vizsgálatainkból kapott adatok azt mutatják, hogy a regulációs mutánsok kutatása konstans növekedési rátán új megvilágítást adhat az adott gének funkcióját tekintve.

Az *A. nidulans* *veA* génjének ortológja a *T. reesei*-ben a *vel1* gén, amely által kódolt protein funkciójának szerepét vizsgáltuk a celluláz gének kifejeződésében és a gomba egyedfejlődésében. A Velvet gén által kódolt *VeA/VeA/VeL1* funkciójának legszembevetőbb szerepe a gombák aszexuális sporulációja, melyet az összes eddig vizsgált gombában valamilyen módon befolyásolt. *T. reesei* esetében mi azt tapasztaltuk, hogy a *vel1* hiánya teljesen megszüntette a konidiospóra képződésének képességet. Ellentétben más gombafajokkal ez a jelenség független volt a fény hatásától. Továbbá a *T. reesei*  $\Delta vel1$  mutáns teljesen elveszítette szexuális egyedfejlődésének képességét fény jelenlétében, ami ugyancsak eltér más gombákban megfigyeltétől. Következésképpen kijelenthetjük, hogy a *T. reesei* *VEL1* funkciója szabályozza a gomba fejlődési folyamatait, de ennek mechanizmusa és a környezeti jelekkel való kapcsolata más, eddig megvizsgált gombával nem analóg. A dolgozatban megvizsgált celluláz enzimeket kódoló gének kifejeződése a  $\Delta vel1$  mutánsban a QM 9414 törzshöz képest nagyon alacsony szintre csökkent laktóz szénforráson való

növekedés közben, amit a fermentlébe kiválasztott extracelluláris enzimek mennyisége és celluláz aktivitása is alátámasztott. Hasonlóan alacsony expressziós szintet tapasztaltunk a *Δvell* mutáns esetén a celluláz gének legerősebb indukáló szénforrásán a szoforózon is, mellyel bizonyossá vált, hogy a cellulázok expressziója teljes mértékben függ a VEL1 funkciójától. Azzal a megállapításunkkal, hogy a *T.reesei vell* génje elengedhetetlen az extracelluláris enzimtermeléshez és a *lae1* már leírt hasonló szerepével együtt azt mutatja, hogy a Velvet komplex nem csak a szekunder metabolizmusban és a gombák egyedfejlődésében játszik szerepet. A Velvet komplex funkciójának kiterjesztése az extracelluláris hidrolitikus enzimek formálására az egyik legjelentősebb tanulsága a vizsgálatainknak, mert a Velvet komplexnek ez a funkciója eddig ismeretlen volt.

Az *A. nidulans* modellszervezetben a szekunder metabolit bioszintézisét a sterigmatocisztin mikotoxin képződésén keresztül lehet a legkönnyebben tanulmányozni. Az ST képződéséhez, ahogyan a legtöbb szekunder metabolithoz is a VeA fehérje normál funkciója szükséges. Ezt bizonyítja az az eredményünk is, hogy a *veA* génről egy pontmutáció következtében képződő VeA1 fehérje jelenlétében az *A. nidulans* 10-15-ször kevesebb ST képzésére képes. Az ST bioszintézisének vizsgálatához így csak a vad típusú (*veA*+) alléllal rendelkező törzsek alkalmasak. Számos tanulmány született az ST képződésének molekuláris szabályozásáról, azonban keveset lehetett tudni a CreA globális regulátor által közvetített karbon katabolit repressziós hatásról az ST bioszintézisében. A karbon katabolit represszálo D-glükóz szénforráson és a derepresszálo laktóz szénforráson tenyésztve az *A. nidulans* vad törzset látszólag ennek a hatását tapasztaltuk, hiszen laktózon már a növekedés közben, míg D-glükózon csak a kifogyását követően indukálódott az ST képződés. CreA mutánst alkalmazva viszont nem igazolódott ez a feltételezés, ráadásul a CreA mutánsra jellemző gyorsabb laktóz metabolizmus eredményeképpen nem tapasztaltunk ST képződést a kezdeti növekedés közben. Az *A. nidulans* vad és CreA mutáns törzseket megvizsgálva alacsony, illetve magas növekedési ráta mellett láthattuk, hogy a lassú növekedés indukálja, míg a magas represszálo az ST termelést. Így megállapíthattuk, hogy szemben a karbon katabolit represszióval és az elérhető szénforrással a tápközegekben, a növekedési ráta az, ami közvetlen

kapcsolatban van az ST képződéssel. A laktóz egy nehezen hasznosítható szénforrás az *A. nidulans* számára (Fekete és mtsai., 2012), és ennek lassú asszimilációja okozza az alacsony növekedési ráta által az ST képződést. Ahogyan a *T. reesei* LAE1 funkciójának vizsgálatakor és az *A. nidulans* ST képződésekor tapasztalhattuk, a konstans növekedési ráta alkalmazása a fonalas gombák tenyésztése során új megvilágításba helyezheti azok szekunder metabolit termelését és génregulációját.

## 5. Introduction and objectives

Ascomycota fungi gain an advantage against their competitors with their extremely diverse metabolism (primer and secondary metabolisms and extracellular enzyme production) for the nutritions. Filamentous fungi are industrially important producers of drugs and food additives, but they also have a devastating impact on human and animal health and economy. Beneficial secondary metabolites (SMs) include antibacterial agents such as penicillin, antifungal agents such as caspofungin, anticancer drugs such as taxol, immunosuppressive drugs such as ciclosporin, or cholesterol-lowering drugs such as lovastatin (Newman and Cragg, 2012). Prominent examples of deleterious SMs are aflatoxins, a group of mycotoxins produced by several *Aspergillus* species, followed by citrinin and patulin, which are produced by *Aspergillus* and *Penicillium* species, and *Fusarium*-specific toxins such as zearalenone. Fungi are not only producers of SMs, but are also industrially exploited to produce enzymes (e.g. cellulases, amylases) or food additives (e.g. citric acid). Genes encoding the enzymes responsible for the biosynthesis of these metabolites are often clustered in fungal chromosomes. Gene clusters tend to be transcriptionally co-regulated by a variety of different genetic mechanisms that range from specific regulation by DNA binding transcription factors to global regulation via changes in chromatin structure (Palmer and Keller, 2010; Strauss and Reyes- Dominguez, 2011).

Discovery of the LaeA methyltransferase 10 years ago opened up a new horizon on the control of SM research when it was found that expression of many SM gene clusters is controlled by LaeA. While the molecular function of LaeA remains an enigma, discovery of the Velvet family proteins as interaction partners further extended the role of the LaeA beyond secondary metabolism. The nuclear Velvet complex consists of the velvet-domain proteins VeA and VelB and the putative methyltransferase LaeA acting as a global regulator for secondary metabolism, fungal development and pathogenicity. Most studies on *veA* and *laeA* have been carried out in *Aspergillus nidulans*, where this gene has been described to control biosynthesis of sterigmatocystin (Bayram et al, 2008). In *Trichoderma reesei*, LaeA ortholog LAE1 appears to predominantly regulate genes involved in

increasing competitive fitness in its environment, including expression of cellulases and polysaccharide hydrolases.

In this study we examined two apparently different processes, sterigmatocystin (ST) formation of *Aspergillus nidulans* and cellulase production of *Trichoderma reesei*, albeit the regulation and the circumstances of the induction show high similarity in both cases. The functions of Velvet complex forming proteins in spite of their conserved features are not general in filamentous fungi.

Environmental factors are well known to influence the formation of Velvet complex which affect ST formation (Abdollahi et al., 1981; Keller et al., 1997) and cellulose production, so we used fermentation processes and kept temperature, pH, DO levels and light intrusion at preset values. Under these conditions we wanted to examine our genetic mutants:

(1) While the impact of the Velvet complex on the regulation of secondary metabolite production has been well documented in numerous fungi, only two papers have so far reported the participation of *veA/velA* in the regulation of extracellular enzyme synthesis: Kamerewerd et al., 2011; Duran et al., 2014. Previous studies have described that LAE1 is essential for cellulase gene expression (Seiboth et al., 2012), independent of the underlying mechanism, raised the hypothesis that this function may require a functional Velvet complex. To test this hypothesis, we have therefore cloned and functionally characterized the ortholog of the central component of the VELVET complex, VeA, from *T. reesei*. Since LAE1 and VEL1, as in other fungi, can physically interact in *T. reesei* (Karimi-Aghchzeh et al., 2013), we assumed that cellulase expression would also be affected by *vel1*.

(2) In *T. reesei*, *lae1* mutants are also differing in their growth rates, being slower in the loss-of-function mutant and faster in mutants overexpressing *lae1* (Seiboth et al., 2012). Therefore, we chose to use chemostat cultures on D-glucose as a carbon source at two different growth rates (one carbon catabolite repressing and one carbon catabolite derepressing) to investigate the genomewide changes in gene expression in relation to LAE1 function, using *Δlae1* and *OELae1* recombinant mutant strain of *T. reesei*.

(3) The characterization of *veA* began more than 50 years ago, when E. Käfer obtained the first *veA* mutant in *A. nidulans*, *veA1* (Käfer, 1965). In contrast to the wild-type VeA, the truncated VeA1 protein was found in the cytoplasm and *veA1* mutant background *A. nidulans* strains are produced less amount of ST (Stinnett et al, 2007). We wanted to compare the ST production of *veA1* mutant and wild-type *veA* strains ST under our fermentation conditions.

(4) While the AF/ST biosynthetic pathway is well-characterized in *A. nidulans* with all the structural genes and intermediates described, many of the regulatory aspects, including those related to the carbon source available for the fungus, are still enigmatic (Maggio-Hall et al., 2005). This is particularly true for the heterodisaccharide lactose (milk sugar), the main carbohydrate in cheese whey, which is traditionally considered a cheap and abundant industrial growth substrate for micro-organisms, fungi in particular. The “lactose effect” can be summarized as the ability of some *A. nidulans* ST production mutants to still synthesize ST on lactose. We were curious about the role of lactose on ST formation.

## 6. Materials and methods

### 6.1. *Aspergillus nidulans* and *Trichoderma reesei* strains used in this study

*A. nidulans* strains used in this study are listed in Table 1. Conventional genetic techniques based on meiotic recombination were used to create a carbon catabolite derepressed  $\Delta creA$  strain with *veA*<sup>+</sup> background by Clutterbuck (1974). *A. nidulans* ZNEF 8.55 a  $\Delta creA$  mutant with a *veA*<sup>+</sup> (wild-type) allele was obtained through crossing strains *creA* $\Delta 4$  (carrying  $\Delta creA$  and *veA1* mutations) and RJMP 155.55 (carrying a *veA*<sup>+</sup> allele). Progenies were selected using a PCR-based method (Han et al., 2010).

**Table 1. *Aspergillus nidulans* strain used in this study.**

Strain	Genotype	References
RDIT 9.32	<i>veA</i> <sup>+</sup>	Tsitsigiannis et al., (2004)
RDIT 2.3	<i>veA1</i>	Tsitsigiannis et al., (2004)
R21	<i>yA2; pabaA1; veA1</i>	Fantes and Roberts (1973)
V100 <sup>a</sup>	<i>creA</i> $\Delta 4$ ; <i>pantoB100</i> ; <i>veA1</i>	Shroff et al., (1997) <sup>b</sup>
RJMP 155.55	<i>riboB2</i> ; <i>wA3</i> , <i>veA</i> <sup>+</sup>	Prof. Nancy P. Keller
ZNEF 8.55 <sup>c</sup>	<i>creA</i> $\Delta 4$ ; <i>pantoB100</i> ; <i>riboB2</i> ; <i>wA3</i> ; <i>veA</i> <sup>+</sup>	Németh et al., (2016)

<sup>a</sup> Offspring from an outcross of the original mutant (Dr. Michel Flipphi, unpublished); <sup>b</sup> Reference to the original *creA* $\Delta 4$  mutant strain; <sup>c</sup> Offspring of a cross between V100 and RJMP 155.55.

*T. reesei* strains used throughout this work are listed in Table 2. *T. reesei* QM9414 (ATCC 26921), a moderately cellulase producing mutant, and the mutants *Alae1* and *OElae1* prepared from Karimi-Aghchegh et al., 2013, were used throughout this work.

**Table 2. *Trichoderma reesei* strain used in this study.**

<b>Strain</b>	<b>Genotype</b>	<b>References</b>
QM 9414	<i>mat1-2</i>	Seidl et al., (2009)
CBS 999.79	<i>mat1-1</i>	Seidl et al., (2009)
CPK 3793	<i>Δlae1</i>	Seiboth et al., (2012)
CPK 4087	<i>OElae1</i>	Seiboth et al., (2012)
RKA 12	<i>OEvel1; mat1-2</i>	Karimi-Aghchesh et al., 2014
RKA 13	<i>OEvel1; mat1-2</i>	Karimi-Aghchesh et al., 2014
RKA 14	<i>Δvel1; mat1-2</i>	Karimi-Aghchesh et al., 2014
RKA 17	<i>Δvel1; mat1-2</i>	Karimi-Aghchesh et al., 2014
RKA 18	<i>Δvel1; mat1-2</i>	Karimi-Aghchesh et al., 2014

## **6.2. Culture conditions and media**

### **6.2.1. *Aspergillus nidulans***

The modified *Aspergillus* Minimal Medium (AMM2) for shake flask cultures and submerged (liquid) bioreactor cultivations was formulated and inoculated as described by Fekete et al., 2002. AMM2 is similar to AMM (Pontecorvo et al., 1953) but includes ammonium dihydrogen phosphate ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ; 8 g/L) as the sole nitrogen source, as well as 0.1 g/L calcium chloride ( $\text{CaCl}_2$ ). Vitamins and other supplements were added from sterile stock solutions. To quantitatively assess specific growth rates, biomass and ST yields, fermentations were carried out in 9 L glass bioreactors, (Inel Ltd., Budapest, Hungary) with a working volume of 6 L and equipped with two six-blade Rushton disc turbine impellers. The pH was controlled with the automatic addition of 3 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  or 3 M NaOH solutions. Dissolved oxygen (DO) levels were maintained at 20% saturation and were controlled by means of the agitation (=stirring) rate. Carbon sources, unless stated differently,



were used at 1.5% (w/v) initial concentration. Mycelia were pregrown in AMM2 containing glycerol as a carbon source, harvested after 24 h by filtration on a sintered glass funnel, washed with cold sterile tap water and transferred into fresh AMM2 containing other carbon sources. Shake-flask cultures were inoculated with  $10^8$  *A. nidulans* conidia per 100 mL of medium and incubated at 37 °C in 500 mL glass Erlenmeyer flasks in a rotary shaker at 200 rpm. To exclude any regulatory effects by light (Han et al., 2010; Bayram et al., 2008), fermentations were performed in constant darkness. Fed-batch fermentations with repeated supplemental D-glucose feeding (10–10 g/L) were performed in the same 6 L bioreactor. The temperature, pH, agitation and aeration conditions were as for the batch fermentation.

### **6.2.2. *Trichoderma reesei***

Cultivations on lactose were carried out in 20 L stainless steel bioreactors as described previously (Karaffa et al., 2006), using Mandels-Andreotti medium, except that agitation was 400 rpm. Induction experiments with sophorose were performed as described Sternberg and Mandels (1979), using 20 h old mycelia pregrown on Mandels-Andreotti medium with glycerol (1%, w/v) as a carbon source.

Growth tests on plates were performed on Mandels-Andreotti medium, solidified with 2% (w/v) agar, but without peptone, and the carbon source indicated (1%, w/v).

### **6.2.3. Chemostate cultures**

Chemostat-type continuous cultivations were performed and analyzed as described earlier (Karaffa et al., 2006). Inoculum cultures were pre-grown in 500 ml Erlenmeyer flasks on a rotary shaker (250 r.p.m.) at 30°C in a medium described by Karaffa et al. (2006) with D-glucose (10 g/L) and peptone (0.1 g/L) as carbon sources. The feeding medium contained D-glucose at an initial concentration of 3 g/L, a value low enough to make the culture carbon-limited. Two to four separate steady-states (i.e., independently initiated and run continuous cultures at the constant-mass stage) were sampled and analysed for each dilution rate and fungal strain. Fungal biomass taken from the steady-state chemostat cultures (i. e., from ones that exhibited no changes in biomass dry weight in three successive samples

taken over a period of three residence times, and had very little (0.03 – 0.05 mM) residual D-glucose left in the medium during the same period) were subjected to total RNA extraction or ST extraction. RNA was subsequently divided for the procedures of the microarray and Real-Time PCR analysis, respectively. This way, mycelia growing under identical environmental (and consequently physiological) conditions were used for the two expression analysis methods.

#### **6.4. Analytical methods**

##### Determination of dry cell weight:

Mycelial dry weight (DCW) was determined from 20 mL culture aliquots. The biomass was harvested and washed on a preweighted glass wool filter by suction filtration and the filter dried at 80 °C until constant weight. Data were averaged and deviated by not more than 14%.

##### Determination of carbohydrates concentration

The actual concentration of D-glucose, glycerol and lactose was determined by HPLC analysis with a proton exchange column (Bio-Rad Aminex HPX-87H+; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) using isocratic elution with 10 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at 55 °C and refractive index detection.

##### Determination of sterigmatocystin concentration:

ST was first concentrated in an organic phase due to the relatively low (a few mg per L) level of this compound even in complex fermentation media. A 20 mL sample was extracted thrice with 10 mL of ethyl-acetate, followed by the organic phase being collected and evaporated. Samples were then re-suspended in 1 mL of aceto-nitrile. The isolation of the ST from solid media has a similar method as outlined above but before extraction the cylindrical shaped agar pieces cut directly off the plates had to be melted. The standard error of the extraction was below 5%. Reverse phase high performance liquid chromatography coupled to ultra-violet detection (RP-HPLC-UV; HP 1090 Series L/M Liquid Chromatographs, Agilent-Technologies, Waldbronn, Germany) and authentic standards have been employed to determine ST concentrations. The mobile phase applied was water: acetonitrile (4: 6) mixture buffered with acetic-acid and Na-acetate, at a flow rate of 0.5

mL/min with isocratic elution. Temperature of the column was kept at  $T = 55$  °C, detection occurred at  $\lambda = 245$  nm. Since ST is a relatively stable molecule ( $pK_a = 9.58$ ), pH of the mobile phase (pH 4.76) did not modify structure and thus elution properties, but the acidic solvent was necessary to separate ST from by-products of fungal metabolites. Under these conditions the retention time of ST is 11.9 min.

#### Determination of protein contents and cellulase enzyme activity

Cellulase enzyme activities were determined using carboxymethylcellulose (1%, w/v) (Uzbas et al., 2012). Protein in the culture supernatant was determined by the method of Bradford (1976).

#### Gene expression by quantitative PCR:

DNase treated (DNase I, RNase free; Fermentas) RNA (5  $\mu$ g) was reverse transcribed with the RevertAid First Strand cDNA Kit (Fermentas) according to the manufacturer's protocol with a combination of oligo-dT and random hexamer primers. All qPCR assays were performed on a Bio-Rad (Hercules, CA) iCycler IQ. For the reaction the IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA) was prepared for 25  $\mu$ l assays with standard  $MgCl_2$  concentration (3 mM) and a final primer concentration of 100 nM each. All assays were carried out in 96-well plates. The amplification protocol consisted of an initial denaturation step (3 min at 95 °C) followed by 40 cycles of denaturation (15 sec at 95 °C), annealing (20 sec; for primers and the respective temperature) and elongation (10 sec at 72 °C). Determination of the PCR efficiency was performed using triplicate reactions from a dilution series of cDNA (1; 0.1; 0.01; 0.001). Amplification efficiency was then calculated from the given slopes in the IQ5 Optical system Software v2.0. Expression ratios were calculated using REST Software (Pfaffl et al., 2002). All samples were analyzed in at least two independent experiments with three replicates in each run.

#### Transcriptome analysis:

Mycelia were harvested from steady-state glucose-limited cultures. Total RNAs from cultures with high and low dilution (=specific growth) rate were extracted using SV Total RNA Isolation System (Promega), according to the

manufacturer's instructions. cDNA synthesis, labelling and hybridization was performed by Roche NimbleGen (Roche-NimbleGen, Inc., Madison, WI, USA) with a high density oligonucleotide microarray using 60-mer probes representing the 9.129 genes of *T. reesei* as described by Metz et al., 2011. Microarray scanning, data acquisition and identification of probe sets showing a significant difference ( $p = 0.05$ ) in expression level between the different conditions were performed essentially as described previously (Metz et al., 2011). Genes were identified by the aid of a completely manually annotated *T. reesei* genome database proprietary to C.P.K. The Euclidean distance metric method, as implemented in DNASTAR v5.1.2. build 3 (DNASTAR Inc., Madison, WI), was used for Hierarchical Clustering. Genes were then classified according to their major annotation in the MIPS Functional Catalogue (Mizzen and Allis 1998). To determine whether there were differences in the functional categories in each cluster, the distribution within each cluster was compared to the total distribution of all the annotated genes using independent chi-square tests. The microarray data and the related protocols are available at the GEO web site ([www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)) under accession number GSE55652.

#### Nucleic acid isolation and hybridization:

Fungal mycelia were harvested by filtration, washed with distilled cold water, frozen and ground under liquid nitrogen. For extraction of genomic DNA, plasmid DNA and RNA, purification kits (Wizard Genomic DNA Purification Kit, PureYield Plasmid Midiprep System and RNeasy plant kit, respectively, all from Promega) were used according to the manufacturer's protocol. Standard methods were used for electrophoresis, blotting and hybridization of nucleic acids.

#### **6.5. Fungal morphology**

Fungal morphology was investigated by means of an Axio-Vision AC quantitative image analyser system (Version 4.6.3, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany, 2007). Samples were analysed under a Zeiss AxioImager microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), equipped with AxioCam MRc5 camera.

### **6.6. Analysis of sexual and asexual development**

For sexual reproduction, *T. reesei* parent and mutant strains and the compatible mating partner strain CBS 999.79 (Chen et al., 2012) were pre-grown on PDA for 4 days, and agar culture plugs then transferred on fresh PDA on opposite sides of the plate at a 1 cm distance from the edge. The plates were kept at room-temperature and exposed to day light or kept in complete darkness for 4–7 days. All pairs of strains which formed fruiting bodies were visually inspected until the maturation stage was achieved and ascospores were dispersed. Monoascospore cultures were isolated by dispersing the solution with a cotton swab on multiple PDA plates. After overnight incubation several single germinated spores were selected with an aid of a stereomicroscope, transferred to a new PDA plate and cultivated at 28 °C.

### **6.7. Bioinformatic analysis**

Identification of PEST regions (protein domains that are enriched in proline, glutamic acid, serine, and threonine residues) that may lead to rapid protein degradation, typical for unstable proteins, was performed with epestfind (Rechsteiner et al., 1987); <http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/epestfind>). The cellular localization of proteins was analyzed by WoLF PSORT (Protein Subcellular Localization Prediction tool; Horton et al., 2007; <http://wolfsort.org/>), and leucine-rich nuclear export signals (NES) identified by NetNES 1.1 Server (la Cour et al., 2004; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>).

## 7. New Scientific Results

- Our study shows that *T. reesei vell* knock-out strains almost completely lacked conidiation.
- Sexual development of *T. reesei* (assayed by the formation of fertile perithecia) requires a functional VEL1 protein: the  $\Delta vell$  strain (mat1-2) did not produce any fruiting bodies when mated with the *T. reesei* tester strain CBS 999.79 (mat1-1).
- VEL1 is essential for cellulase and hemicellulase transcript accumulation and enzyme production in *T. reesei*.
- The extension of the function of the Velvet complex towards formation of extracellular hydrolytic enzymes is intriguing, because a regulatory interaction of secondary metabolism and fungal development is already well established, whereas such a link with hydrolases is so far unknown.
- The effect of LAE1 on secondary metabolism in *T. reesei* appears to be growth rate dependent, and more pronounced at the high growth rate.
- Our data showed that only a comparatively small percentage of the genes that are affected by LAE1 modulation (i.e. 10%) are in fact clustered in the genome.
- We show that the expression of 50% of the GCN5-N-acetyltransferases (GNATs) present in the *T. reesei* genome is altered in the  $\Delta lae1$  strain. A subgroup of GNATs is known to acetylate histones at specific lysine residues, a process that leads to transcriptional activation and has been implicated in chromatin assembly (Grunstein 1997; Mizzen and Allis 1998). In addition, LAE1 targets were obtained of which the GCN5-N-acetyltransferases may offer a new understanding of the mechanism of LAE1 action.
- Another group of genes that were significantly influenced by LAE1 in this study were amino acid transporters. This finding is also consistent with the observation that *T. reesei* prefers amino acids as

carbon sources when grown in the presence of cellulose or lactose and amino acid mixtures.

- The sterigmatocystin production was 10–15 times higher in *Aspergillus nidulans* strains which containing the wild-type allele than in strains which containing a single base pair mutation at the full length *veA* start codon called *veA1*.
- The growth rate that seems to have a direct, causal relationship with sterigmatocystin formation in *Aspergillus nidulans*. The low growth rate caused by its slow assimilation will trigger sustained sterigmatocystin formation.
- Our data show that investigation of the transcriptome in a regulatory mutant and examination of secondary metabolites at constant growth rates may reveal new insights into the function of the respective gene and regulation of secondary metabolism.

## 8. Summary

The trimeric Velvet protein complex consists of LaeA, VeA and VelB, and regulates secondary metabolism and development in *A. nidulans*, and pathogenesis on plants and humans in other genera. Most studies on *veA* have been carried out in *Aspergillus* spp., where this gene has been described to control photodependent development, secondary metabolism and pathogenesis-associated processes. We have known that the expression of genes for lignocellulose degradation in *T. reesei* is further obligatorily dependent on the function of the protein methyltransferase LAE1 (Seiboth et al, 2012), the orthologue of the *A. nidulans* regulator of secondary metabolism and development LaeA. LAE1 is essential for cellulase gene expression, raising the hypothesis that this function may require a functional Velvet complex. While the impact of the Velvet complex on the regulation of secondary metabolite production has been well documented in numerous fungi, only two papers have so far reported the participation of *veA/velA* in the regulation of extracellular enzyme synthesis (Kamerewerd et al., 2011; Duran et al., 2014). We have therefore cloned and functionally characterized the ortholog of the central component of the VELVET complex, VeA, from *T. reesei* (VEL1). Our study shows that the *vel1* knock-out strains almost completely lacked conidiation and sexual development in *T. reesei*. Interestingly, overexpression of *vel1* under a constitutive, light-independent promoter (*tef1*) enabled *T. reesei* to form some sterile primordia in darkness, an ability not shown by the wild type strains. We have shown that VEL1 also regulates developmental processes in *T. reesei*, that cannot be deduced from analogy with other fungal systems. We provide evidence that the expression of cellulases in *T. reesei* is completely dependent on a functional *vel1* gene and suggests that cellulase expression is indeed regulated by the Velvet complex. The extension of our findings to all cellulases and hemicellulases of *T. reesei* appears justified because they are co-regulated by sophorose and lactose, and thus - although we quantified only the transcripts of two cellulases and one xylanase - it can be safely assumed that the others are affected in the same manner too. In addition, we have shown that the expression of the central regulator of cellulase and hemicellulase



biosynthesis, XYR1 as well, is strongly reduced albeit not eliminated. Our study show that the regulatory targets of the Velvet complex reach beyond mere secondary metabolism and development. The extension of the function of the Velvet complex towards formation of extracellular hydrolytic enzymes is intriguing, because a regulatory interaction of secondary metabolism and fungal development is already well established, whereas such a link with hydrolases is so far unknown.

Reverse genetics relies on the use of molecular biological methods to discover the function of a gene by analyzing the phenotypic effects that result from a manipulation of its function. While this approach mostly leads to valid information about the role of a gene in the physiology of the respective organism, some caveats are to be applied when these mutants are studied by -omics techniques: many gene mutants also display altered growth rates, and thus studying their gene or protein expression on plates or in batch cultures will inevitably also identify genes whose expression is controlled only by the growth rate itself. This may lead to flawed interpretations as to the potential targets of the investigated genes, particularly in the case of regulatory genes. In *T. reesei*, *lae1* mutants are also differing in their growth rates. Therefore, we chose to use chemostat cultures on D-glucose as a carbon source at two different growth rates (one carbon catabolite repressing and one carbon catabolite derepressing) to investigate the genomewide changes in gene expression in relation to LAE1 function, using *Δlae1* and *OELae1* recombinant mutant strain of *T. reesei*. The corresponding results confirm several previously detected targets, but also reveal new findings: on one hand, the effect of LAE1 becomes mainly visible upon its deletion whereas overexpression has only a little effect. Also genomic clustering of the *lae1*-effected transcripts was observed to a much lower extent than previously shown by Karimi-Aghcheh et al. (2013), and is thus either due to the use of glucose as a carbon source or the use of constant growth rates for comparison. However, we detect for the first time that *lae1* gene deletion affects the regulation of gene expression by the growth rate. The latter finding likely points to an indirect influence, and suggests that LAE1 influences the formation of both positive as well negative signals or regulators of the respective genes. On the other hand, additional LAE1

targets were obtained of which the GCN5-N-acetyltransferases may offer a new understanding of the mechanism of LAE1 action. Our data show that – using *T. reesei* LAE1 as a model – the investigation of the transcriptome in a regulatory mutant at constant growth rates may reveal new insights into the function of the respective gene.

The velvet gene (*veA*) of *A. nidulans* is involved in the regulation of a variety of cellular processes such as asexual and sexual development as well as secondary metabolism (Calvo 2008). A single base pair mutation at the full length *veA* start codon is called *veA1*. Two *veA1* mutant strains were tested for sterigmatocystin (ST) production and compared to a wild-type (*veA*) strain and the biomass-specified ST production was 10-15 times higher in the strain containing the wild-type allele. The ST biosynthetic pathway is well-characterized in *A. nidulans*, but many of the regulatory aspects related to the carbon source available for the fungus are still enigmatic. We have shown that ST forms only after D-glucose is depleted from the medium, while on lactose, ST appears when the majority of the carbon source is still available. These data suggested that ST formation may either be mediated by a carbon catabolite regulatory mechanism or induced by low specific growth rates attainable on lactose. These hypotheses were tested by constant-mass chemostat-type continuous fermentations on D-glucose as a sole carbon source at two different dilution rates ( $D = 0.090 \text{ h}^{-1}$  and  $D = 0.020 \text{ h}^{-1}$ ), representing a state of carbon catabolite repression and derepression, respectively. ST production under such conditions negatively correlated with the dilution rate, i.e., no ST formed at high growth rate, while low growth rate led to the formation of  $0.4 \text{ mg L}^{-1}$  ST. Essentially identical results were obtained with a CreA mutant strain, indicating that CreA does not regulate the formation of ST during growth on D-glucose. Since the residual D-glucose concentration was set close to zero in each chemostat culture irrespective of the dilution rate, we also concluded that the depletion of D-glucose itself is not an initiator but rather a prerequisite for ST biosynthesis through the cessation of growth. Lactose is a poor carbon source for *A. nidulans*, and we believe the low growth rate caused by its slow assimilation will trigger sustained ST formation. By the same token, faster growth means the fungus has to put more resources into primary metabolism by creating

cell materials needed for growth, and has less ability to shunt to ST. When lactose utilization rate gets higher (as in the CreA loss-of-function mutants), ST production will not occur before its complete exhaustion, just like on D-glucose. We concluded that low specific growth rates may be the primary cause of sustained, mid-growth ST formation on the slowly assimilating lactose in *A. nidulans*, and that carbon utilization rates likely play a general regulatory role during biosynthesis.

## 9. Irodalomjegyzék / References

1. Akel E, Metz B, Seiboth B, Kubicek CP (2009) Molecular regulation of arabinan and L-arabinose metabolism in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Eukaryot Cell* 8:1837-1844.
2. Bayram Ö, Krappmann S, Ni M, Bok JW, Helmstaedt K, Valerius O, Braus-Stromeyer S, Kwon NJ, Keller NP, Yu JH, Braus GH (2008a) VeB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* 320: 1504-1506.
3. Berovic M, Legisa M (2007) Citric acid production. *Biotechnol Annu Rev.* 13:303–343
4. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
5. Brown A. Fed-batch and continuous culture. In: McNeil B, Harvey LM, editors. *Fermentation: A Practical Approach*. Oxford: University Press; 1990. pp. 113–130.
6. Calvo AM (2008) The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi. *Fungal Genet Biol.* 45: 1053-1061.
7. Chen CL, Kuo HC, Tung SY, Hsu PW, Wang CL, Seibel C, Schmoll M, Chen RS, Wang TF (2012) Blue light acts as a double-edged sword in regulating sexual development of *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *PLoS One* 7:e44969.
8. Clutterbuck AJ (1974): *Aspergillus nidulans*. In: King, R.C. (Ed.), *Handbook of Genetics, Bacteria, Bacteriophages, and Fungi*, vol.1. Plenum Press, New York, 447-510.
9. Duran RM, Gregersen S, Smith TD, Bhetariya PJ, Cary JW, Harris-Coward PY, Mattison CP, Grimm C, Calvo AM (2014) The role of *Aspergillus flavus* *veA* in the production of extracellular proteins during growth on starch substrates. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:5081-5094.
10. Fantes PA, Roberts CF (1973)  $\beta$ -Galactosidase activity and lactose utilization in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol.* 77: 471-486.
11. Fekete E, Karaffa L, Sándor E, Seiboth B, Bíró S, Szentirmai A, Kubicek CP (2002) Regulation of the intracellular  $\beta$ -galactosidase activity of *Aspergillus nidulans*. *Arch Microbiol.* 179: 7-14.
12. Fekete E, Karaffa L, Seiboth B, Fekete É, Kubicek CP, Flippin M (2012) Identification of a permease gene involved in lactose utilisation in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol.* 49: 415-425.
13. Grunstein M (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 389:349–352.
14. Han KP, Park JS, Chae KS, Han DM (2010): Simple identification of *veA1* mutation in *Aspergillus nidulans*. *J Microbiol.* 48: 885-887.
15. Horton P, Park KJ, Obayashi T, Fujita N, Harada H, Adams-Collier CJ, Nakai K (2007) WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res.* 35: 585-587
16. Jorgensen TR, van Kuyk PA, Poulsen BR, Ruijter GJG, Visser J, Iversen JJJ (2007) Glucose uptake and growth of glucose-limited chemostat cultures of *Aspergillus niger* and a disruptant lacking MstA, a high-affinity glucose transporter. *Microbiology* 153: 1963-1973.
17. Kaefer E (1965) Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 52: 217–232.

18. Kamerewerd J, Zadra I, Kürnsteiner H, Kück U. (2011) Pch1B1, encoding a class V chitinase, is affected by PcVela and PcLaeA, and is responsible for cell wall integrity in *Penicillium chrysogenum*. *Microbiology* 157:3036-48.
19. Karaffa L, Fekete E, Gamauf C, Szentirmai A, Kubicek CP, Seiboth B (2006) D-galactose induces cellulase gene expression in *Hypocrea jecorina* at low growth rates. *Microbiology* 152: 1507-1514.
20. Karimi-Aghcheh R, Bok JW, Phatale PA, Smith KM, Baker SE, Lichius A, Omann M, Zeilinger S, Seiboth B, Rhee C, Keller NP, Freitag M, Kubicek CP (2013) Functional analyses of *Trichoderma reesei* LAE1 reveal conserved and contrasting roles of this regulator. *G3*. 3:369-378.
21. Karimi-Aghcheh R, Németh Z, Atanasova L, Fekete E, Paholcsek M, Sándor E, Aquino B, Druzhinina IS, Karaffa L, Kubicek CP (2014) The Velvet a orthologue VEL1 of *Trichoderma reesei* regulates fungal Development and is essential for cellulase gene expression. *PLoS ONE* 9: e112799.
22. Keller NP, Nesbitt C, Sarr B, Philips TD, Burow GB (1997) pH regulation of sterigmatocystin and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus* spp. *Phytopathology* 87: 643-648.
23. Maggio-Hall LA, Wilson RA, Keller NP (2005) Fundamental contribution of beta-oxidation to polyketide mycotoxin production in planta. *Mol Plant Microbe In.* 18: 783-793.
24. Mandels M, Andreotti RE (1978) Problems and challenges in the cellulose to cellulase fermentation. *Process Biochem.* 13: 6-13.
25. Metz B, Seidl-Seiboth V, Haarmann T, Kopchinskiy A, Lorenz P, Seiboth B, Kubicek CP (2011) Expression of biomass-degrading enzymes is a major event during conidium development in *Trichoderma reesei*. *Eukaryot Cell.* 10:1527-1535.
26. Mizzen CA, Allis CD (1998) Linking histone acetylation to transcriptional regulation. *Cell Mol Life Sci.* 54:6-20.
27. Németh Z, Molnár AP, Fejes B, Novák L, Karaffa L, Keller NP, Fekete E (2016) Growth-phase sterigmatocystin formation on lactose is mediated via low specific growth rates in *Aspergillus nidulans*. *Toxins* 8: 354.
28. Newman DJ, Cragg GM (2012) Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod.* 75:311-335.
29. Ni M, Yu JH (2007) A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* 2: e970.
30. Palmer JM, Keller NP (2010) Secondary metabolism in fungi: does chromosom allocation matter? *Curr Opin Microbiol.* 13:431-436.
31. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30:e36
32. Pontecorvo G, Roper JA, Chemmons LM, Macdonald KD, Bufton AWJ (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet.* 5:141-238.
33. Portnoy T, Margeot A, Linke R, Atanasova L, Fekete E, Sándor E, Hartl L, Karaffa L, Druzhinina IS, Seiboth B, Le Crom S, Kubicek CP (2011) The CRE1 carbon catabolite repressor of the fungus *Trichoderma reesei*: a master regulator of carbon assimilation. *BMC Genomics* 12: 269.
34. Rechsteiner M, Rogers S, Rote K (1987) Protein structure and intracellular stability. *Trends Biochem Sci.* 12: 390-394
35. Seiboth B, Karimi RA, Phatale PA, Linke R, Hartl L, Sauer DG, Smith KM, Baker SE, Freitag M, Kubicek CP (2012) The putative protein methyltransferase LAE1

- controls cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. *Mol Microbiol*. 84:1150-1164.
36. Seidl V, Seibel C, Kubicek CP, Schmoll M (2009) Sexual development in the industrial workhorse *Trichoderma reesei*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106:13909-13914.
  37. Shroff RA, O'Connor SM, Hynes MJ, Lockington RA, Kelly JM (1997) Null alleles of *creA*, the regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol*. 22: 28–38.
  38. Singh OV, Kumar R (2007) Biotechnological production of gluconic acid: future implications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 75:713–722
  39. Sternberg D, Mandels GR (1979) Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose. *J Bacteriol*. 139:761-769.
  40. Stinnett SM, Espeso EA, Cobefio L, Araújo-Bazán L, Calvo AM (2007) *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin  $\alpha$  carrier and on light. *Mol Microbiol*. 63: 242-255.
  41. Strauss J, Y. Reyes-Dominguez (2011) Regulation of secondary metabolism by chromatin structure and epigenetic codes. *Fungal Genet Biol*. 48: 62–69.
  42. Tsitsigiannis DI, Zarnowski R, Keller NP (2004) The lipid body protein, PpoA, coordinates sexual and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem*. 279:11344-11353.
  43. Uzbas F, Sezerman U, Hartl L, Kubicek CP, Seiboth B (2012) A homologous production system for *Trichoderma reesei* secreted proteins in a cellulase-free background. *Appl Microbiol Biotechnol*. 93:1601-1608
  44. Veiga T, Nijland JG, Driessen AJ, Bovenberg RA, Touw H, van den Berg MA, Pronk JT, Daran JM (2012) Impact of velvet complex on transcriptome and penicillin G production in glucose-limited chemostat cultures of a  $\beta$ -lactam high-producing *Penicillium chrysogenum* strain. *OMICS* 16:320–333.



Nyilvántartási szám: DEENK/181/2017.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Németh Zoltán  
Neptun kód: CQLOUM  
Doktori Iskola: Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10047416

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

#### Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (3)

1. **Németh, Z.**, Molnár, Á. P., Fejes, B., Novák, L., Karaffa, L., Keller, N. P., Fekete, E.: Growth-phase sterigmatocystin formation on lactose is mediated via low specific growth rates in *Aspergillus nidulans*.  
*Toxins*. 8 (12), 354, 2016. EISSN: 2072-6651.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/toxins8120354>  
IF: 3.030
2. Karimi Aghcheh, R., **Németh, Z.**, Atanasova, L., Fekete, E., Paholcsek, M., Sándor, E., Aquino, B., Druzhinina, I. S., Karaffa, L., Kubicek, C. P.: The VELVET A orthologue VEL1 of *Trichoderma reesei* regulates fungal development and is essential for cellulase gene expression.  
*PLoS One*. 9 (11), e112799-1 - e112799-10, 2014. EISSN: 1932-6203.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0112799>  
IF: 3.234
3. Fekete, E., Karaffa, L., Karimi Aghcheh, R., **Németh, Z.**, Fekete, É., Orosz, A., Paholcsek, M., Stágel, A., Kubicek, C. P.: The transcriptome of *lae1* mutants of *Trichoderma reesei* cultivated at constant growth rates reveals new targets of LAE1 function.  
*BMC Genomics*. 15, 447-1 - 447-10, 2014. ISSN: 1471-2164.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-15-447>  
IF: 3.986





---

További közlemények

Időgen nyelvű közlemények hazai folyóiratban (1)

4. Jónás, Á., Fekete, E., **Németh, Z.**, Flippi, M., Karaffa, L.: D-Galactose catabolism in *Penicillium chrysogenum*: Expression analysis of the structural genes of the Leloir pathway.  
*Acta Biol. Hung.* 67 (3), 318-332, 2016. ISSN: 0236-5383.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/018.67.2016.3.9>  
IF: 0.506 (2015)

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 10,756

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
10,25

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2017.06.16.







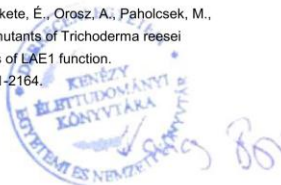
Registry number: DEENK/181/2017.PL  
Subject: PhD Publikációs Lista

Candidate: Zoltán Németh  
Neptun ID: CQLOUM  
Doctoral School: Pál Juhász-Nagy Doctoral School of Biology and Environmental Sciences  
MTMT ID: 10047416

### List of publications related to the dissertation

#### Foreign language scientific articles in international journals (3)

1. **Németh, Z.**, Molnár, Á. P., Fejes, B., Novák, L., Karaffa, L., Keller, N. P., Fekete, E.: Growth-phase sterigmatocystin formation on lactose is mediated via low specific growth rates in *Aspergillus nidulans*.  
*Toxins*. 8 (12), 354, 2016. EISSN: 2072-6651.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/toxins8120354>  
IF: 3.030
2. Karimi Aghcheh, R., **Németh, Z.**, Atanasova, L., Fekete, E., Paholcsek, M., Sándor, E., Aquino, B., Druzhinina, I. S., Karaffa, L., Kubicek, C. P.: The VELVET A orthologue VEL1 of *Trichoderma reesei* regulates fungal development and is essential for cellulase gene expression.  
*PLoS One*. 9 (11), e112799-1 - e112799-10, 2014. EISSN: 1932-6203.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0112799>  
IF: 3.234
3. Fekete, E., Karaffa, L., Karimi Aghcheh, R., **Németh, Z.**, Fekete, É., Orosz, A., Paholcsek, M., Stágel, A., Kubicek, C. P.: The transcriptome of lae1 mutants of *Trichoderma reesei* cultivated at constant growth rates reveals new targets of LAE1 function.  
*BMC Genomics*. 15, 447-1 - 447-10, 2014. ISSN: 1471-2164.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-15-447>  
IF: 3.986





---

List of other publications

Foreign language scientific articles in Hungarian journals (1)

4. Jónás, Á., Fekete, E., **Németh, Z.**, Flippi, M., Karaffa, L.: D-Galactose catabolism in *Penicillium chrysogenum*: Expression analysis of the structural genes of the Leloir pathway.  
*Acta Biol. Hung.* 67 (3), 318-332, 2016. ISSN: 0236-5383.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/018.67.2016.3.9>  
IF: 0.506

Total IF of journals (all publications): 10,756

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 10,25

The Candidate's publication data submitted to the iDEa Tudóstér have been validated by DEENK on the basis of Web of Science, Scopus and Journal Citation Report (Impact Factor) databases.

16 June, 2017



### **Előadások/ Presentations:**

#### **1) NÉMETH Z**

Lactose induction of sterigmatocystin formation in *Aspergillus nidulans*  
4th Central European Forum for Microbiology [CEFORM], Keszthely, 2013)

#### **2) NÉMETH Z**

A *Trichoderma reesei* gomba vell (Velvet ortológ) génje nélkülözhetetlen a celluláz gének kifejeződésére  
(A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely, 2014)

#### **3) NÉMETH Z**

*Aspergillus nidulans* sterigmatocisztin képződésének vizsgálata folyékony táptalajban, laktóz és D-glükóz szénforrásokon  
(A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése és a XII. Fermentációs Kollokvium Keszthely, 2016)

### **Posztterek/ Posters:**

#### **1) NÉMETH Z, NOVÁK L, NAGY N, FEKETE E, KELLER NP, KARAFFA L**

A novel HPLC-UV method to detect sterigmatocystin formation from submerged cultures of *Aspergillus nidulans*  
(4th Central European Forum for Microbiology [CEFORM] , Keszthely, 2013)

#### **2) OROSZ A, ONDECS Á, MATOLCSI CS, NÉMETH Z, KARAFFA L, FEKETE E**

Identification of the true inducer of the *bgaD* (beta-galactosidase-encoding) gene in *Aspergillus nidulans* upon growth on D-galactose  
(4th Central European Forum for Microbiology [CEFORM], Keszthely, 2013)

#### **3) TÖRÖK T, PAPP B, KÖKÉNYESI A, KOLLÁTH I, SÁNDOR E, NÉMETH Z, FEKETE E, KARAFFA L**

Cultivation of a slow-growing bacterium strain into high cell density  
(4th Central European Forum for Microbiology [CEFORM], Keszthely, 2013)

- 4) NÉMETH Z, FEKETE E, NOVÁK L, FEJES B, KELLER NP, KARAFFA L

Lactose induction of sterigmatocystin formation in *Aspergillus nidulans*  
(12th European Conference of Fungal Genetics, Sevilla, Spanyolország, 2014)

- 5) OROSZ A, ONDECS A, MATOLCSI C, NÉMETH Z, KARAFFA L, FEKETE E

Identification of the inducer of the *bgaD* (beta-galactosidase-encoding) gene in *Aspergillus nidulans* upon growth on D-galactose  
(12th European Conference of Fungal Genetics, Sevilla, Spanyolország, 2014)

- 6) KARAFFA L, TÖRÖK T, KÖKÉNYESI A, KOLLÁTH I, SÁNDOR E, NÉMETH Z, LIPTÁK N, FEKETE E, PAPP B

High cell density cultivation of the chemolithoautotrophic bacterium *Nitrosomonas europaea* in a dialysis membrane bioreactor  
(16th European Congress on Biotechnology, Edinburgh, Skócia, 2014)

- 7) KARAFFA L, NÉMETH Z, MOLNÁR ÁP, FEJES B, NOVÁK L, KELLER NP, FEKETE E

Growth-phase sterigmatocystin formation on lactose is mediated via low specific growth rates in *Aspergillus nidulans*  
(29th Fungal Genetics Conference, Asilomar, CA, USA, 2017; 14th International Aspergillus Meeting, Asilomar, CA, USA)